Die Hemmung der Skorpiongiftwirkung am Ranvierschen Schnürring durch Calciumionen

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Otmar Schmitt

Saarbrücken

1971

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus dem I. Physiologischen Institut der
Universität des Saarlandes
Direktor: Professor Dr. Robert STÄMPFLI

Die Hemmung der Skorpiongiftwirkung am Ranvierschen Schnürring durch Calciumionen

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung der
Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
1970
vorgelegt von
Otmar SCHMITT
geboren am 3. April 1943 in Eiweiler-Saar

Dekan: Professor Dr. H.J. KULENKAMPFF
Referent: Professor Dr. H. SCHMIDT

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 11. 2. 1971 abgelegt.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
METHODE	3
Elektrophysiologische Meßanordnung	5
Nomenklatur und formale Behandlung der Versuchsergebnisse	8
Lösungen und Substanzen	9
ERGEBNISSE	10
I. Das Aktionspotential	10
II. Der Natriumstrom	11
1. Die Strom-Spannungskurve	11
2. Die Natriumpermeabilität P_{Na}	14
3. Der zeitliche Verlauf der Natriumpermeabilität	15
4. Die Inaktivierung von P_{Na}	19
III. Der Kaliumstrom	22
DISKUSSION	25
ZUSAMMENFASSUNG	29
LITERATURVERZEICHNIS	31

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

EINLEITUNG

Das Aktionspotential des Ranvierschen Schnürrings wird durch Zusatz bestimmter Substanzen wie Tetraaethylammonium oder $NiCl_2$ zur Außenlösung deutlich verlängert (TASAKI, 1959; MEVES, 1963; SCHMIDT und STÄMPFLI, 1966). Die in dieser Hinsicht wirksamste Substanz ist jedoch das Skorpiongift; unter seinem Einfluß nimmt die Dauer des Aktionspotentials bis zum 10 000-fachen des Normalwertes zu (ADAM und Mitarb., 1966). Dabei zeigt das Aktionspotential eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Aktionspotential der Purkinje- und Ventrikelfasern des Herzens; außerdem erlangt die Schnürringsmembran die Fähigkeit zur spontanen Erregungsbildung. Skorpiongift verändert demnach die Eigenschaften der erregbaren Membran des Schnürrings so, daß sie sich ähnlich verhält wie die Membran der Schrittmacherzellen im Sinusknoten des Herzens.

Die Analyse der Ionenströme durch KOPPENHÖFER und SCHMIDT (1968 a und b) hatte ergeben, daß Skorpiongift eine unvollständige und stark verlangsamte Inaktivierung der Natriumpermeabilität ebenso wie eine Abnahme und eine verlangsamte Aktivierung der Kaliumpermeabilität hervorruft. Ganz ähnliche Veränderungen der spezifischen Ionenpermeabilitäten wurden von mehreren Autoren diskutiert, um die langdauernden Aktionspotentiale der Purkinje- und Ventrikelfasern auf der Grundlage der HODGKIN-HUXLEY-Theorie zu erklären (WEIDMANN, 1951; BRADY und WOODBURY, 1960; NOBLE, 1962; DECK und TRAUTWEIN, 1964; McALLISTER und NOBLE, 1966).

Es ist andererseits bekannt, daß die extrazellulären Calciumionen auf die Ionenpermeabilitäten der erregbaren Membran von Herz-

muskelzellen (WEIDMANN, 1951), Tintenfischriesenfasern (FRANKENHAEUSER und HODGKIN, 1957) und markhaltigen Nervenfasern des Frosches (FRANKENHAEUSER, 1957 b; HILLE, 1968 b) einen großen Einfluß haben. Das gilt auch für den mit Skorpiongift behandelten Schnürring; in den Versuchen von ADAM und Mitarb. (1966) bewirkte eine Erhöhung der Calciumionen-Konzentration der Außenflüssigkeit eine weitgehende Blockierung der Skorpiongiftwirkung; die Spontantätigkeit hörte schlagartig auf, und die extrem langen Aktionspotentiale wurden bis auf wenige msec verkürzt.

Diese Wirkung der Calciumionen ist nicht nur von Interesse für die Aufklärung der Mechanismen, welche den Durchtritt von Natrium- und Kaliumionen durch erregbare Membranen steuern, sie ist darüber hinaus auch von Bedeutung im Zusammenhang mit der Therapie der durch Skorpionstiche hervorgerufenen Vergiftungserscheinungen, welche unter generalisierten Krämpfen zum Tode führen können.

METHODE

Die Experimente wurden an einzelnen motorischen Nervenfasern des afrikanischen Krallenfrosches Xenopus laevis, mit der von NONNER (1969) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Versuchstemperatur betrug 20,5 bis 25° C, der Faserdurchmesser variierte zwischen 15 und 20 µ. Die nach der Methode von STÄMPFLI (1952) aus einem kleinen motorischen Ast des N. tibialis freipräparierten Fasern wurden so in eine mit Ringerlösung gefüllte Plexiglaskammer eingelegt, daß der zu untersuchende Schnürring über der engsten Stelle des Faches A zu liegen kam (Abb. 1). Die Oberfläche der Kammer war mit Vaseline gründlich eingefettet, und auf die Trennwände zwischen E und A, A und B, B und L, L und C war je eine Vaselinewurst von etwa 100 µ Dicke aufgetragen worden. Durch Auflegen weiterer Vaselinewürste auf die Trennwände zwischen den Kompartimenten kam die Faser an diesen Stellen zwischen zwei Vaselineschichten zu liegen (Abb. 2). Die Stumpfenden des Präparates wurden mit Vaseline am Boden der Tröge E und C fixiert. Dann wurde die Kammer auf das Mündungsstück eines Vielwegehahns aufgesteckt, die Kompartimente E, A, B und C wurden mittels Hebern mit Quecksilber-Kalomel-Elektroden verbunden. Anschließend wurde so viel Flüssigkeit von der Kammer abgesaugt, daß die Flüssigkeitsbrükken zwischen den Kompartimenten abrissen. Nach Absaugen der Flüssigkeit aus L erhielt man einen Luftspalt zwischen den Trögen B und C. Gleichzeitig mit Öffnen des Zulaufhahns wurde eine Wasserstrahlpumpe in Gang gesetzt, welche die überschüssige Ringerlösung durch die Abflußöffnung b absaugte. Auf diese Weise wurde eine kontinuierliche Bespülung des Schnürrings (1 bis 2 ml/min) und ein konstantes Flüssigkeitsniveau gewährleistet. In

Kompartiment E und C wurde die Ringerlösung durch isotonische KCl-Lösung ersetzt. Mit einer ophthalmologischen Schere wurde die Faser kurz vor dem in E befindlichen Schnürring abgeschnitten.

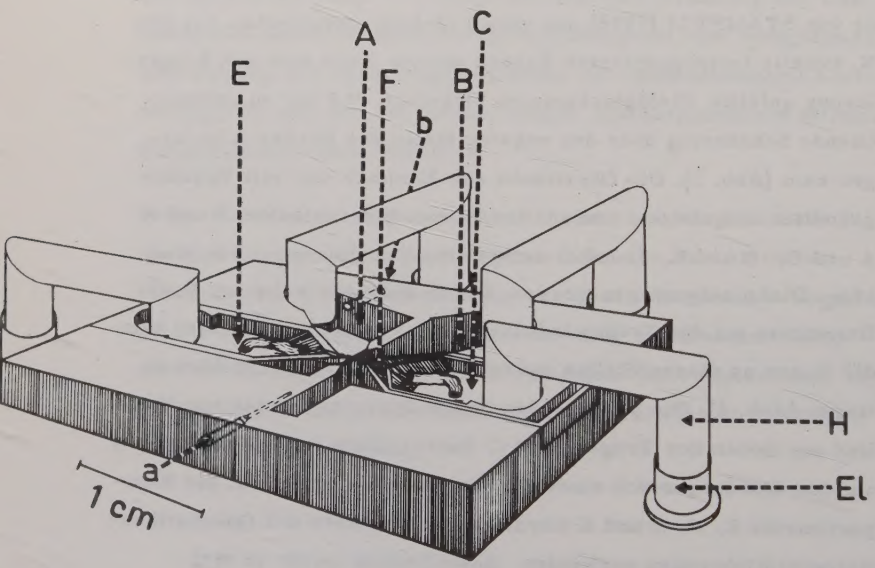

Abb. 1 Die Kammer besteht aus einem Plexiglasblock, in den mehrere Kompartimente eingefräst sind. E und C sind Tröge zur Aufnahme der beiden Nervenstümpfe, in A liegt der zu untersuchende Schnürring S; B Erdfach, L Luftspalt, a Bohrung zur Aufnahme des Zuflußstutzens, b Anschlußstelle für die Wasserstrahlpumpe. H Heber, welche die Kompartimente mit Quecksilber-Kalomel-Elektroden El verbinden.

Elektrophysiologische Meßanordnung

Abb. 3 zeigt das Schaltbild der zur Messung von Aktionspotentialen und Membranströmen verwendeten Methode (NONNER, 1969),

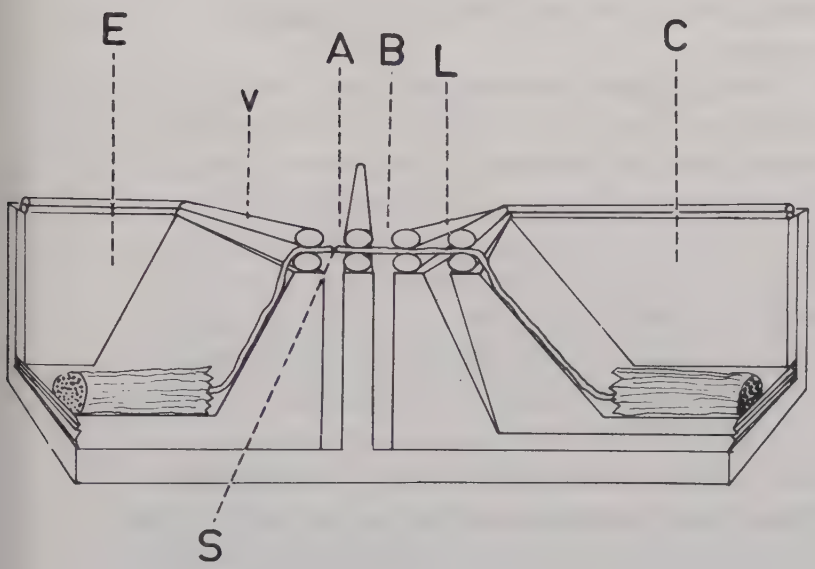

Abb. 2 Längsschnitt durch die Plexiglaskammer.
A, B, C, E und L wie in Abb. 1; v Doppelschicht von Vaselinewürsten, zwischen denen die Nervenfaser liegt;
S Schnürring.

die eine Abwandlung der von DODGE und FRANKENHAEUSER (1958) angegebenen Gegenkopplungsanordnung darstellt und Messungen bei Zimmertemperatur erlaubt. Die Registrierung der Meßgrößen erfolgte mit einem Kathodenstrahloszillographen Typ 565 von Tektronix (Beaverton, Oregon).

a) Registrierung von Aktionspotentialen (current clamp Anordnung)

Sie erfolgt in Stellung 1 des Doppelschalters in Abb. 3. Durch die mit dem Reizgerät (Imp) an E angelegte Rechteckspannung wurde der Schnürring in A depolarisiert. Das dadurch ausgelöste Aktionspotential rief einen Längsstrom hervor, der an R_{a3} einen Spannungsabfall verursachte. Dieser wurde vom Eingang des Gegenkopplungsverstärkers a registriert, verstärkt und mit umgekehrtem Vorzeichen auf A gegeben, so daß der Stromzufluß zwischen D und C unterdrückt wurde. Die hierzu vom Verstärkerausgang gelieferte Spannung ist mit guter Annäherung gleich der den Längsstrom verursachenden Spannung und kann infolgedessen dem Aktionspotential gleichgesetzt werden.

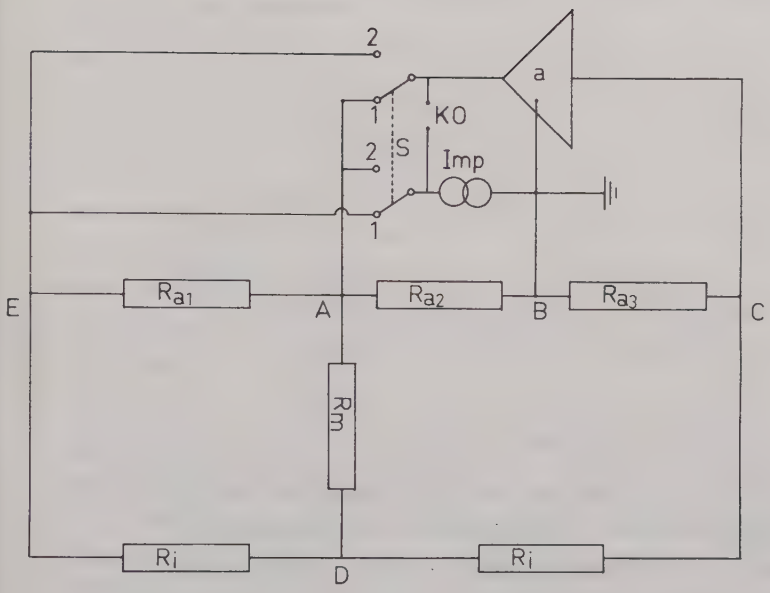

Abb. 3 Meßanordnung. Zur Registrierung von Aktionspotentialen wurde Schalter S in Stellung 1 gebracht; Reizgerät (Imp) war dann mit E, Verstärker a mit A verbunden. In voltage clamp Anordnung (Schalter S in Stellung 2) war der Ausgang des Verstärkers a mit E, das Reizgerät mit A verbunden. E, A, B, C sind Quecksilber-Kalomel-Elektroden, die mit den gleichnamigen Kompartimenten durch Agar-Heber verbunden waren (siehe Abb. 1). R_{a1}, R_{a2} und R_{a3} sind die Außenwiderstände zwischen den durch Vaseline voneinander getrennten Trögen; R_m Membranwiderstand des zu untersuchenden Schnürrings; R_i Innenwiderstand des Axoplasmas. D entspricht der Innenseite des Schnürrings; KO Kathodenstrahloszillograph.

b) Registrierung der Membranströme bei vorgegebener Spannung (voltage clamp Anordnung)

Dazu wurde der Schalter S in Stellung 2 gebracht. Mit Hilfe des Reizgerätes wurde das Potential am Punkt A variiert; die hierbei fließenden Längsströme wurden wiederum vom Verstärker als Spannungsabfall zwischen C und B registriert und durch die Verstärkerausgangsspannung über E unterdrückt, so daß D stets auf dem gleichen Potential gehalten wurde. Zwischen der vom Verstärker gelieferten Spannung (V) und dem Membranstrom (I) besteht nach FRANKENHAEUSER (1962) folgende Beziehung:

$$I = \frac{V}{14\ \Omega \cdot cm^2}$$

Eine Stabilisieranordnung zwischen Verstärker- Ein- und Ausgang verhinderte Oszillationen des Gegenkopplungssystems (ausführliche Schilderung der Versuchsanordnung siehe NONNER, 1969).

Nomenklatur und formale Behandlung der Versuchsergebnisse.

Das Membranpotential E des Schnürrings wurde in voltage clamp Versuchen zwischen den Testimpulsen auf seinem normalen Ruhewert E_r festgehalten; E_r wurde mit - 70 mV angenommen (FRANKENHAEUSER, 1957a). Änderungen von E werden im Text mit V bezeichnet; $V = E - E_r$. Depolarisation und Auswärtsstrom haben positive Vorzeichen.

Aus den registrierten Gesamtströmen wurden die spezifischen Natrium- und Kaliumströme nach Korrektur um den kapazitiven Strom und den Leckstrom ermittelt; letztere wurden aus hyperpolarisierenden Impulsen gewonnen.

Lösungen und Substanzen

Die Ringerlösung hatte folgende Zusammensetzung (mMol/l): NaCl 110, 5; KCl 2, 5; $NaHCO_3$ 2, 4; $CaCl_2$ 1, 8. Die zur Unterdrückung der Skorpiongiftwirkung benutzte Lösung enthielt 7, 2 mMol/l $CaCl_2$. Diese Lösung wird im folgenden als calciumreiche Lösung bezeichnet. Der pH-Wert der Lösungen war 7, 6.

Gefriergetrocknetes Skorpiongift von Leiurus quinquestriatus (Gewinnung und Reinigung siehe ADAM und Mitarb., 1966), wurde den Lösungen in der Konzentration von 10^{-6} g/ml zugesetzt. Dieses Gift ist in seiner chemischen Zusammensetzung wahrscheinlich dem Gift von Androctonus australis ähnlich, aus dem ROCHAT und Mitarb. (1967) zwei chemisch reine Fraktionen, Neurotoxin I und II, isolieren konnten. Diese Neurotoxine bestehen aus Ketten von 64 Aminosäuren, wobei bestimmte Aminosäuresequenzen beiden Fraktionen gemeinsam sind. Die für die charakteristischen Veränderungen an der Schnürringmembran verantwortlichen Wirkungsgruppen sind jedoch nicht bekannt.

In einigen Versuchen enthielten die Lösungen auch Tetraaethylammoniumchlorid (TEA; 5 mMol/l; FLUKA-AG, Buchs-Schweiz).

ERGEBNISSE

I. Das Aktionspotential

In Abb. 4, a ist das Aktionspotential eines Schnürrings in Ringerlösung dargestellt, das unter dem Einfluß von Skorpiongift (b) durch Ausbildung einer ausgeprägten Plateauphase von etwa 1 msec auf 8 sec verlängert wurde. Gleichzeitig nahm

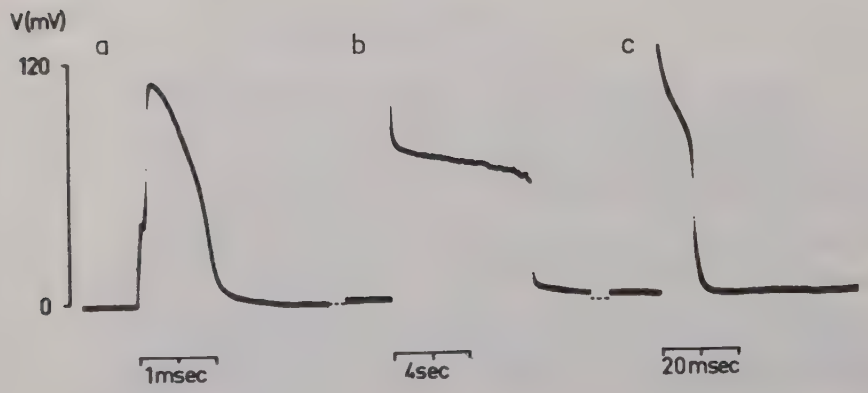

Abb. 4 Aktionspotential eines Ranvierschen Schnürrings in Ringerlösung (a), 5 min nach Beginn der Bespülung mit skorpiongifthaltiger Lösung (b) und unmittelbar nach Umschalten auf calciumreiche Lösung (c). Man beachte die starke Verkürzung des durch Skorpiongift verlängerten Aktionspotentials in der calciumreichen Lösung.

das Spitzenpotential deutlich ab; außerdem sieht man eine geringe Depolarisation. Nach Umschaltung auf calciumreiche Lösung (c) wurde das Aktionspotential stark verkürzt und das Spitzenpotential nahm wieder zu. Diese Wirkung der Calciumionen wurde bereits von ADAM und Mitarb. (1966) beschrieben; die ihr zugrunde liegenden Änderungen der Membranströme werden im folgenden analysiert.

II. Der Natriumstrom

1. Die Strom-Spannungskurve

Abb. 5 zeigt den während eines depolarisierenden Impulses von V = 60 mV fließenden Membranstrom in Ringerlösung (a), in Ringerlösung mit Skorpiongift (b) und in calciumreicher Lösung (c). Da alle Lösungen TEA enthielten und die Kaliumpermeabilität daher praktisch Null war (KOPPENHÖFER, 1967; KOPPENHÖFER und SCHMIDT, 1968a), enthalten die Stromregistrierungen nur noch den unveränderten und zeitunabhängigen Leckstrom sowie den spezifischen Natriumstrom. Dieser steigt am normalen Schnürring sehr schnell auf ein Maximum an und fällt anschließend innerhalb von etwa 10 msec durch Inaktivierung so stark ab, daß nur noch der auswärts gerichtete Leckstrom übrig bleibt. Durch das Skorpiongift wird der Spitzenwert des Natriumstromes reduziert, die Inaktivierung so sehr verzögert, daß nach 70 msec noch ein beträchtlicher Nettoeinwärtsstrom zu sehen ist. Die Erhöhung der Calcium-Konzentration reduziert die Amplitude des Natriumspitzenstromes weiter; die Inaktivierung ist viel deutlicher ausgeprägt als in b, so daß der Membranstrom nach etwa 15 msec bereits auswärts gerichtet ist.

Trägt man die Spitzenwerte der Natriumströme gegen die Impulsamplitude auf, so erhält man die Kurven a, b und c der Abb. 6. Alle Kurven schneiden die Potential-

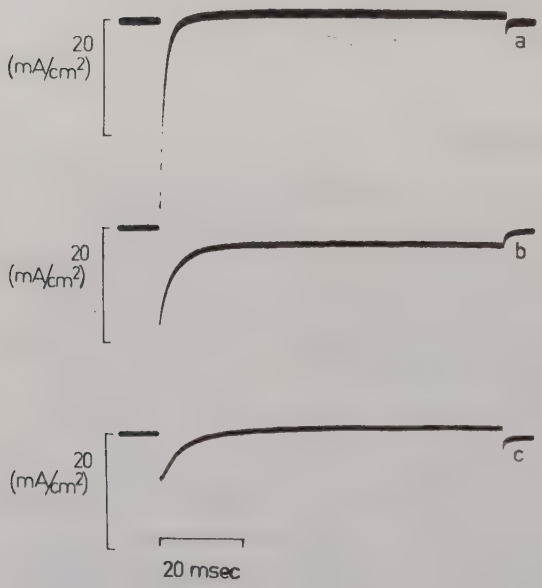

Abb. 5 Membranströme während depolarisierender Impulse von V = 60 mV in Ringerlösung (a), Ringerlösung mit Skorpiongift (b) und in calciumreicher Lösung (c). Man beachte die Abnahme der Natriumspitzenströme in b und c gegenüber a, sowie besonders die Hemmung des späten Einwärtsstromes durch Calciumionen. Alle Lösungen enthielten 5 mM TEA/l.

achse annähernd beim gleichen Wert, dem Natrium-Gleichgewichtspotential V_{Na}. Die Natriumspitzenströme werden unter dem Einfluß von Skorpiongift (b) bei $V < 33$ mV etwas größer, bei stärkeren Depolarisationen

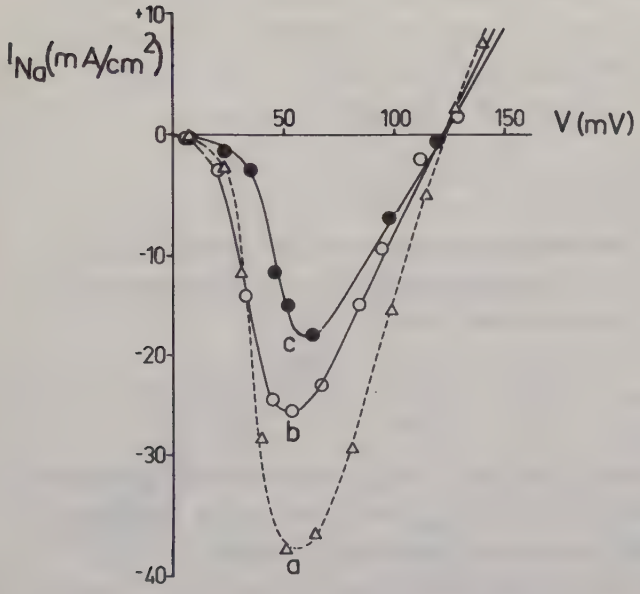

Abb. 6 Natriumstrom-Spannungskurve in Ringerlösung (a), Ringerlösung mit Skorpiongift (b) und calciumreicher Lösung (c). Ordinate: Natriumspitzenströme in mA/cm^2; Abszisse: Änderung des Membranpotentials (V) in mV. Man beachte die Abnahme der Natriumspitzenströme in b und c gegenüber a, sowie die Rechtsverschiebung des Maximums der Strom-Spannungskurve durch Calciumionen. Die Kurven wurden nach Augenmaß durch die Meßpunkte gelegt.

aber kleiner als vor der Vergiftung (a). Die Maxima der Kurven a und b liegen bei V = 54 mV. Durch die Erhöhung der Calcium-Konzentration werden die Natriumspitzenströme bei allen Potentialwerten kleiner. Das Maximum der Kurve c ist um etwa 10 mV nach rechts verschoben. Diesen Änderungen des spezifischen Natriumstromes liegen Änderungen der Potential- und Zeitabhängigkeit der Natriumpermeabilität zugrunde, die in den folgenden Abschnitten näher untersucht werden.

2. Die Natriumpermeabilität P_{Na}

Aus den Natriumspitzenströmen kann die Natriumpermeabilität P_{Na} mit Hilfe der constant-field Gleichung (GOLDMANN, 1943) berechnet werden.

$$P_{Na} = I_{Na} \cdot \frac{RT}{EF^2} \cdot \frac{1}{(Na)_a} \cdot \frac{e^{EF/RT} - 1}{e^{(E-E_{Na}) \cdot F/RT}{}_{-1}} \qquad (1)$$

Abb. 7 zeigt die aus den in Abb. 6 dargestellten Stromwerten errechneten Werte von P_{Na}. Man sieht, daß die Natriumpermeabilität am normalen Schnürring bei Depolarisationen von über 100 mV einen Maximalwert von etwa $4 \cdot 10^{-3}$ cm/sec erreicht. Skorpiongift verursacht eine geringe Linksverschiebung und eine Abnahme des Maximalwertes um etwa 40 %. Durch Zusatz von Calcium wird die P_{Na}-V-Kurve um etwa 12 mV nach rechts verschoben. Der bei großen Depolarisationen erreichte Sättigungswert wird dagegen nicht verändert.

3. Der zeitliche Verlauf der Natriumpermeabilität

Nach der Ionentheorie (HODGKIN und HUXLEY, 1952) wird P_{Na} von den potential- und zeitabhängigen Variablen m und h in folgender Weise bestimmt:

$$P_{Na} = \overline{P}_{Na} \cdot m^a \cdot h \qquad (2)$$

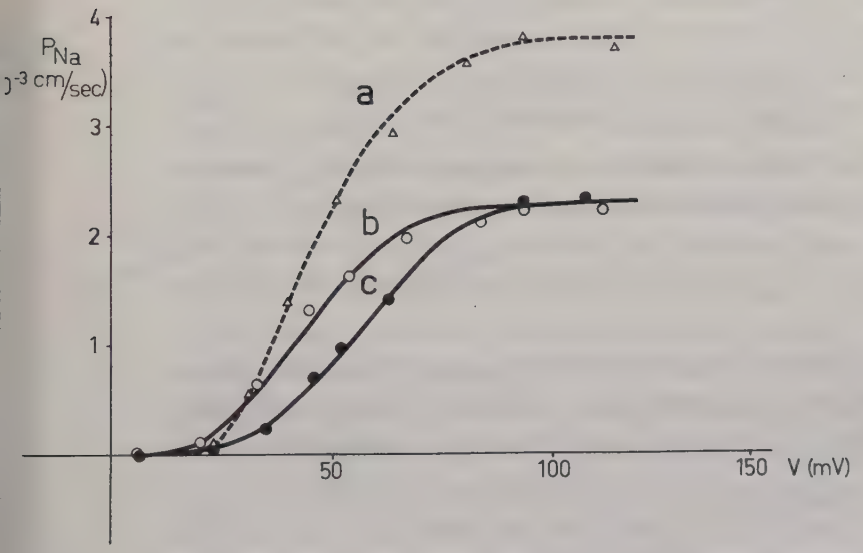

Abb. 7 Beziehung zwischen Natriumpermeabilität und Membranpotential in Ringerlösung (a), Ringerlösung mit Skorpiongift (b) und calciumreicher Lösung (c). Ordinate: Natriumpermeabilität P_{Na} in 10^{-3} cm/sec, errechnet aus den individuellen Natriumspitzenströmen nach Gleichung (1). Abszisse: Amplitude der depolarisierenden Impulse in mV. Die Kurven sind nach Augenmaß durch die Meßpunkte gelegt.

$\overline{P_{Na}}$ ist eine Konstante mit der Dimension einer Permeabilität; sie hat den numerischen Wert von P_{Na}, wenn $m = h = 1$. Während einer Depolarisation steigt m vom Anfangswert m_o, der beim normalen Ruhepotential annähernd Null ist, mit der Zeitkonstanten τ_m auf den stationären Wert m_∞ an, der für Depolarisationen von $V \geqq 100$ mV den Maximalwert 1 annimmt. Gleichzeitig nimmt h von seinem Anfangswert h_o, der beim normalen Ruhepotential etwa 0,8 ist, auf den stationären h_∞-Wert ab, der für $V \geqq +30$ mV gleich Null ist. Die Änderung von h verläuft etwa zehnmal langsamer als die von m, d.h. die Zeitkonstante τ_h ist etwa zehnmal so groß wie τ_m.

Der zeitliche Verlauf der Natriumpermeabilität P_{Na} kann daher durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$P_{Na} = \overline{P_{Na}} \cdot \left(m_\infty - (m_\infty - m_o) \cdot e^{-t/\tau_m} \right)^a \cdot \left(h_\infty - (h_\infty - h_o) \cdot e^{-t/\tau_h} \right) \quad (3)$$

Wird jedoch das Membranpotential vor der Applikation depolarisierender Impulse von $V \geqq +30$ mV auf seinem normalen Wert $V = 0$ gehalten, so vereinfacht sich Gleichung (3) zu:

$$P_{Na} = P'_{Na} \cdot \left(1 - e^{-t/\tau_m}\right)^a \cdot e^{-t/\tau_h} \quad (4)$$

Dabei ist: $$P'_{Na} = \overline{P_{Na}} \cdot m_\infty \cdot h_o \quad (5)$$

Trägt man die mit Hilfe von Gleichung (1) aus den Natriumströmen errechneten P_{Na} - Werte halblogarithmisch gegen die Zeit auf, so erhält man für den unvergifteten Schnürring einen S -förmigen Anstieg, dem sich ein linearer Abfall anschließt. Unter Skorpiongifteinwirkung ist die Anstiegsphase praktisch unverändert, aber nur der frühe Teil der Abfallphase ist li-

near (KOPPENHÖFER und SCHMIDT, 1968a). Durch Extrapolation dieses Kurventeils bis zum Impulsbeginn ($t = 0$) kann $P^{\bullet}_{Na}$ bestimmt werden. Aus den mit depolarisierenden Impulsen verschiedener Amplitude bestimmten Werten von $P^{\bullet}_{Na}$ ergeben sich gemäß Gleichung (6) die entsprechenden m_∞-Werte:

$$m_\infty = \sqrt[a]{\frac{P^{\bullet}_{Na}}{\overline{P}_{Na} \cdot h_o}} \qquad (6)$$

$\overline{P}_{Na} \cdot h_o$ ist der bei starken Depolarisationen erreichbare Maximalwert von $P^{\bullet}_{Na}$. Die nach Gleichung (6) errechnete m_∞- V-Kurve (Abb. 8), die durch Skorpiongift um etwa 8 mV nach links verschoben wurde, erfuhr nach Erhöhung der Calcium-Konzentration eine Verschiebung nach rechts um etwa 8 mV über die normale Kurve hinaus.

Zur Bestimmung des Exponenten a in Gleichung (6) wurden die während eines depolarisierenden Impulses gemessenen Natriumströme halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Die Differenzen zwischen der durch Extrapolation des linearen Kurventeils erhaltenen Geraden und den gemessenen Stromwerten wurden durch den extrapolierten Wert bei $t = 0$ dividiert. Die dritte Wurzel des Quotienten ergab eine Gerade. Daher wurde $a = 3$ angenommen und in Gleichung (6) zur Bestimmung von m_∞ eingesetzt. Aus der Steilheit dieser Geraden ergab sich τ_m, das durch Skorpiongift nicht verändert wurde. Dieser Befund stimmt mit den Beobachtungen von KOPPENHÖFER und SCHMIDT (1968a) überein.

Durch Erhöhung der Calcium-Konzentration der skorpiongifthaltigen Ringerlösung nahm τ_m bei $V = 65$ mV von 0,04 msec

auf 0,06 msec zu. Einen ähnlichen Effekt hatte HILLE (1968b) am unvergifteten Schnürring bei Erhöhung der Calcium-Konzentration beobachtet.

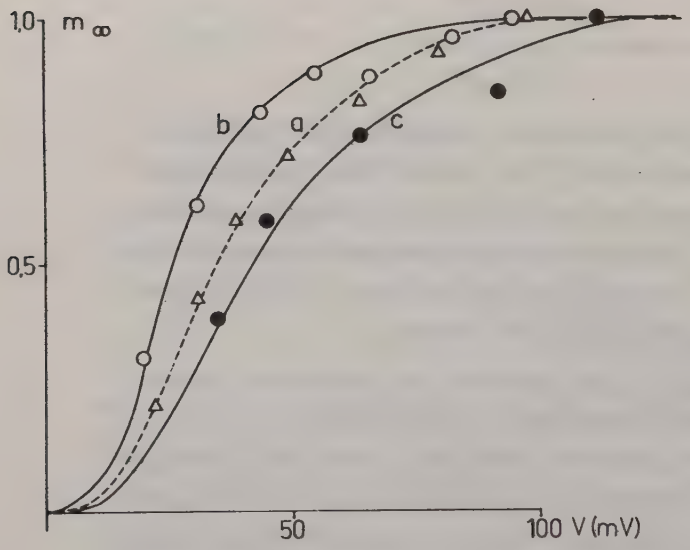

Abb. 8 Beziehung zwischen m_∞ und Membranpotential V in Ringerlösung (a), Ringerlösung mit Skorpiongift (b) und calciumreicher Lösung (c). Die Kurven sind nach Augenmaß durch die Meßpunkte gelegt. Man beachte die starke Verschiebung der Kurve b durch Erhöhung der Calcium-Konzentration (c).

4. Die Inaktivierung von P_{Na}

Wie oben schon erwähnt, beschreibt die Variable h in Gleichung (2) die Inaktivierung der Natriumpermeabilität. Das Verfahren zur Bestimmung der stationären h_∞ - Werte am normalen Schnürring besteht darin, daß unmittelbar an einen genügend langen Vorimpuls V_1 ein Testimpuls V_2 von etwa 50 mV appliziert wird. Dieser löst einen Natriumstrom aus, dessen Amplitude von V_1 abhängt. Dividiert man die bei verschiedenen Vorimpulsamplituden gemessenen Natriumströme durch den bei $V_1 < -40$ mV erreichbaren Maximalwert, so erhält man die Werte der h_∞ - Kurve.

Da h_∞ jedoch in Skorpiongift für $V_1 > +40$ mV nicht Null wurde, sondern einen endlichen Wert beibehielt, konnte für $V_1 > V_2$ der Natriumspitzenstrom während V_2 mit dieser Methode nicht gemessen werden. Diese Schwierigkeit wurde mit Hilfe eines 2-Impulsexperimentes umgangen, indem V_2 erst im Abstand Δt nach V_1 appliziert wurde. Dabei nahm h im Zeitintervall Δt immer mit derselben Zeitkonstanten τ_h von dem am Ende von V_1 erreichten Wert auf den h_∞ - Wert bei $V = 0$ zu oder ab (KOPPENHÖFER und SCHMIDT, 1968b). Man brauchte also nur τ_h für $V = 0$ zu bestimmen und konnte dann in einfacher Weise aus den für Δt bestimmten h-Werten auf die h-Werte am Ende von V_1 zurückrechnen. Die auf diese Weise erhaltenen h_∞ - Kurven zeigt Abb. 9. Kurve a wurde in normaler Ringerlösung gewonnen, die Kurve b nach Vergiftung des Schnürrings. Man sieht, daß h_∞ am vergifteten Schnürring für $V \geq +40$ mV nicht Null wird, sondern einen endlichen Wert annimmt, der durch Zugabe von Calciumionen zur Aussenlösung (Kurve c) wieder Null wird. Die durch das Skorpiongift hervorgerufene unvollständige Natrium-Inaktivierung wird also durch Calciumionen aufgehoben.

Bei der genaueren Analyse des zeitlichen Verlaufes der Natriumströme des vergifteten Schnürrings ergab sich, daß, ähnlich wie in den Versuchen von KOPPENHÖFER und SCHMIDT (1968a) die Inaktivierung in einer ersten (schnellen)

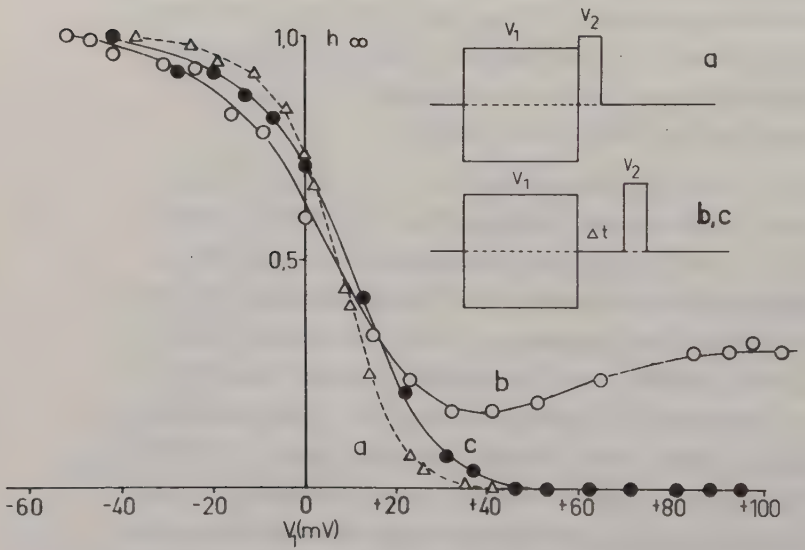

Abb. 9 Die Natrium-Inaktivierungskurve in Ringerlösung (a), Ringerlösung mit Skorpiongift (b) und calciumreicher Lösung (c). Die entsprechenden Einsatzbilder zeigen die dazugehörigen Impulsprogramme. In a war V_1 50 msec, in b und c 500 msec lang. Die unvollständige Natrium-Inaktivierung (b) wird durch Calciumionen (c) beseitigt.

und einer zweiten (langsamen) Phase ablief. Abb. 10 zeigt, daß die Inaktivierung auch bei erhöhter Calcium-Konzentration in zwei Phasen abläuft. Die Differenzwerte zwischen der aus den späten Stromwerten extrapolierten Geraden (langsame Phase) und den Meßwerten wurden wiederum halblogarithmisch

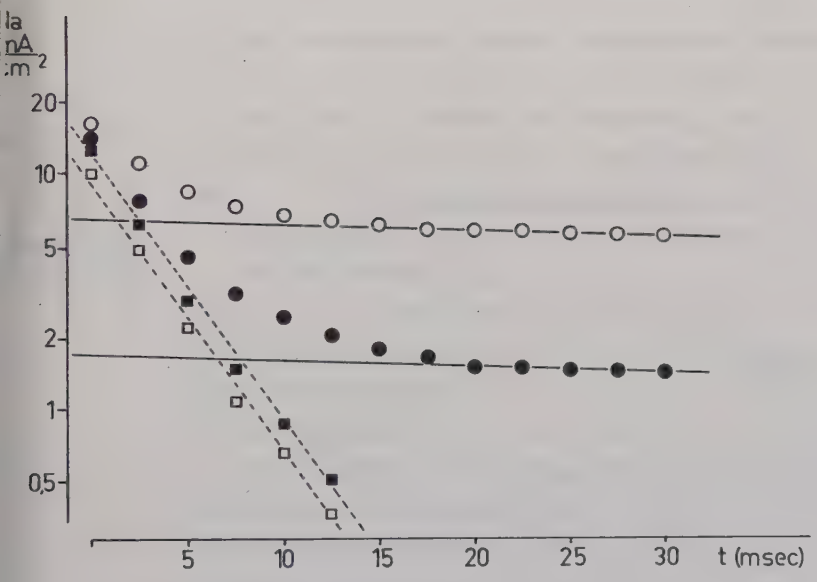

Abb. 10 Der zeitliche Verlauf der Natrium-Inaktivierung während eines depolarisierenden Impulses von V = 60 mV in Ringerlösung mit Skorpiongift (Kreise) und calciumreicher Lösung (Punkte). Ordinate: I_{Na} in mA/cm^2, logarithmische Skala; Abszisse: Dauer des Testimpulses in msec. Die ausgezogenen Linien zeigen den Verlauf der langsamen Phase, die gestrichelten Linien den Verlauf der schnellen Inaktivierungsphase.

aufgetragen. Die auf diese Weise erhaltenen gestrichelten Linien beschreiben den Verlauf der schnellen Inaktivierungsphase. Man sieht, daß beide Inaktivierungsphasen sowohl in Ringerlösung mit Skorpiongift, als auch in calciumreicher Lösung parallel verlaufen. Die Kinetik der Inaktivierung wird demnach durch Calciumionen nicht beeinflußt.

III. Der Kaliumstrom

Die vorstehend beschriebenen Untersuchungen zeigen, daß der spezifische Natriumstrom in calciumreicher Lösung bei Depolarisationen von V > 40 mV auf Null absinkt ($h_\infty \approx 0$); da jedoch die Inaktivierung ebenso langsam erfolgt wie bei normaler Calcium-Konzentration, konnte der zeitliche Verlauf des spezifischen Kaliumstromes in diesem Potentialbereich nicht untersucht werden. Die Messungen beschränkten sich daher auf das Natrium-Gleichgewichtspotential (V_{Na}), bei dem wegen der fehlenden Triebkraft für die Natriumionen kein Natriumstrom fließt. Zunächst wurde an dem mit normaler Ringerlösung bespülten Schnürring bei großer Ablenkgeschwindigkeit des Elektronenstrahles die Amplitude des depolarisierenden Impulses (V) so eingestellt, daß die Stromregistrierung weder einen initialen Einstrom, noch einen initialen Ausstrom erkennen ließ. Dann wurde auf Ringerlösung mit Skorpiongift umgeschaltet; nach etwa sechs Minuten wurde der bei $V = V_{Na}$ fliessende Membranstrom registriert; etwa zwei Minuten nach Erhöhung der Calcium-Konzentration wurde derselbe Impuls noch einmal appliziert. Abb. 11 zeigt einen derartigen Versuch.

Bei der Beurteilung des Calcium-Effektes ist zu beachten, daß der registrierte Membranstrom aus zwei Anteilen, dem unspezifischen Leckstrom und dem spezifischen Kaliumstrom besteht.

Die gesonderte Bestimmung des Leckstromes mit hyperpolarisierenden Impulsen (siehe Methode) ergab, daß er von der Calcium-Konzentration unabhängig war. Das ist auch in Abb. 11 zu sehen, wo die Differenz zwischen der Strom-Null-Linie und dem Beginn der Kurven a und b ziemlich genau dem Leckstrom entspricht. Kurve a zeigt, daß der spezifische

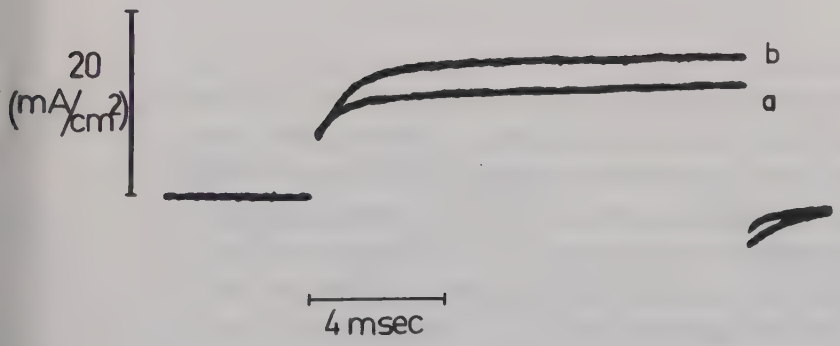

Abb. 11 Membranstrom beim Natrium-Gleichgewichtspotential (V_{Na}). Kurve a stellt den bei V = 133 mV registrierten Membranstrom des vergifteten Schnürrings dar. Vor der Aufnahme der Stromkurve b war auf calciumreiche Lösung umgeschaltet worden; die Stromamplitude nimmt deutlich zu.

Kaliumstrom während der Depolarisation in skorpiongifthaltiger Ringerlösung etwa 5 mA/cm^2 beträgt; das sind 34 % des zu Versuchsbeginn am unvergifteten Schnürring beim gleichen Potential gemessenen Wertes. Nach Erhöhung der Calcium-Konzentration (Kurve b) stieg der Kaliumstrom auf 7,4 mA/cm^2 an. Ähnlich starke Effekte konnten in vier von fünf Versuchen beobachtet werden. Aus den spezifischen Kaliumströmen wurde nach Gleichung (7) die Kalium-Permeabilität P_K berechnet:

$$P_K = I_K \cdot \frac{RT}{EF^2} \cdot \frac{1}{(K)_a} \cdot \frac{e^{EF/RT} - 1}{e^{(E-E_K)\,F/RT}{}_{-1}} \qquad (7)$$

Skorpiongift bewirkte eine Abnahme von P'_K von durchschnittlich $0,6 \cdot 10^{-3}$ cm/sec auf $0,27 \cdot 10^{-3}$ cm/sec. Das entspricht ziemlich genau den Beobachtungen von KOPPENHÖFER und SCHMIDT (1968a). Durch Erhöhung der Calcium-Konzentration nahm P'_K jedoch im Durchschnitt wieder auf $0,41 \cdot 10^{-3}$ cm/sec zu; das ist eine Steigerung um über 50 % gegenüber dem Wert bei normaler Calcium-Konzentration.

In ähnlicher Weise wie beim Natrium-System war auch die Kinetik des Kaliumsystems nicht eindeutig verändert. P_K nahm bei normaler und bei erhöhter Calcium-Konzentration in einer ersten schnellen und einer zweiten langsameren Phase zu, wobei die Zeitkonstanten der beiden Aktivierungsphasen ähnlich waren wie in den Versuchen von KOPPENHÖFER und SCHMIDT (1968a).

DISKUSSION

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen an der mit Skorpiongift behandelten Schnürringmembran ist die Beseitigung der unvollständigen Natrium-Inaktivierung durch Erhöhung der Calcium-Konzentration der Außenlösung. Die Inaktivierungskurve wird wieder steiler, der h_∞-Wert beim normalen Ruhepotential steigt etwas an. Die Kurve gleicht daher weitgehend der Inaktivierungskurve des normalen Schnürrings (Abb. 9), zeigt aber nicht die von HILLE (1968b) in calciumreicher Lösung beschriebene Rechtsverschiebung.

Im Gegensatz zu dem eindrucksvollen Effekt der Calciumionen auf die Inaktivierungskurve steht die Beobachtung, daß die Kinetik des Natriumsystems nicht eindeutig verändert wird. Der zeitliche Verlauf des Anstieges der Natriumpermeabilität wird nur geringfügig verlangsamt. Allerdings sind zur Aktivierung der Natriumpermeabilität in calciumreicher Lösung grössere Depolarisationen notwendig als bei normaler Calcium-Konzentration. Die m_∞-Kurve ist daher deutlich in Depolarisationsrichtung verschoben, ähnlich wie am unvergifteten Schnürring (HILLE, 1968b). Obwohl das Natriumsystem beim Ruhepotential ($V = 0$) in calciumreicher Lösung weniger stark inaktiviert ist als bei normaler Calcium-Konzentration, wird durch die Rechtsverschiebung der m_∞- Kurve doch eine deutliche Abnahme der Natrium-Spitzenströme und die Verschiebung des Maximums der Natrium-Stromspannungskurve in Depolarisationsrichtung hervorgerufen. Erwartungsgemäß ändert sich das Natrium-Gleichgewichtspotential nicht, was daran zu erkennen ist, daß die Kurven beim gleichen Membranpotential die Abszisse schneiden.

Auch der zeitliche Verlauf der Natrium-Inaktivierung wird durch Calciumionen kaum verändert. Ähnlich wie bei normaler Calcium-Konzentration verläuft die Inaktivierung in einer ersten schnellen und einer zweiten langsamen Phase (Abb. 10); beide Komponenten erreichen jedoch bei $V > 40$ mV nach genügend langer Zeit (500 msec) den Wert Null, wie die h_∞-Kurve erkennen läßt. Nach der von HODGKIN und HUXLEY (1952) entwickelten Modellvorstellung kann man sich die Natrium-Inaktivierung so vorstellen, daß geladene Partikel je nach dem Membranpotential den Durchtritt von Natriumionen blockierende oder nichtblockierende Positionen in der Membran einnehmen. In der vergifteten Membran könnte man dementsprechend schnell und langsam wandernde Partikel vermuten, wobei die schnellen Partikel bei Depolarisationen von $V > 40$ mV ihre blockierende Position wieder verlassen (KOPPENHÖFER und SCHMIDT, 1968b). Dieser Vorgang würde durch calciumreiche Lösung verhindert, wodurch die Natrium-Inaktivierung wieder vollständig werden könnte.

Die Beseitigung der unvollständigen Inaktivierung bedeutet, daß die Natriumpermeabilität des vergifteten Schnürrings bei Depolarisation nicht dauernd erhöht bleibt, sondern bereits bei $V \approx 30$ bis 40 mV praktisch auf Null absinkt. Die Voraussetzung für die Aufrechterhaltung einer Dauerdepolarisation, wie sie von ADAM und Mitarb. (1966) an der vergifteten Membran in natriumhaltiger Lösung beobachtet wurde, ist daher nicht mehr gegeben; die Membran muß bei Zugabe von Calciumionen zur Außenlösung repolarisieren.

Die Repolarisation würde unterstützt durch eine gleichzeitige Zu-

nahme der Kaliumpermeabilität. Tatsächlich ergab sich aus dem beim Natrium-Gleichgewichtspotential gemessenen Kaliumstrom eine deutliche Erhöhung von P_K. Obwohl direkte Messungen bei kleineren Depolarisationen (wegen der Schwierigkeiten bei der Bestimmung des spezifischen Kaliumstromes in diesem Potentialbereich) nicht durchgeführt wurden, ist es wahrscheinlich, daß die P_K - Zunahme nicht auf Membranpotentiale im Bereich von V_{Na} beschränkt ist.

Nach der Ionentheorie ist $P_K = P_K^{\bullet} \cdot n^b$ (FRANKENHAEUSER, 1963). Dementsprechend könnte der Anstieg von P_K sowohl auf einer Zunahme von $P_K^{\bullet}$ (der maximalen Kaliumpermeabilität), wie auch auf einer Zunahme der Variablen n beruhen. Aus der Beobachtung, daß die Geschwindigkeit des P_K-Anstieges durch Erhöhung der Calcium-Konzentration nicht verändert wurde, darf man jedoch schließen, daß die P_K-Zunahme durch Erhöhung von $P_K^{\bullet}$ zustande kommt. Entgegen dem Verhalten des unvergifteten Schnürrings, dessen Kaliumpermeabilität nach HILLE (1968b) unabhängig ist von der Calcium-Konzentration, ist demnach unter dem Einfluß von Skorpiongift eine deutliche Calciumempfindlichkeit des Kalium-Systems nachweisbar.

Von vielen Autoren wird die Meinung vertreten, daß die Ionendurchtrittswege in der erregbaren Membran funktionell getrennt sind (Literatur siehe HILLE, 1970). Dieses Unabhängigkeitsprinzip der "Kanäle" kommt besonders gut in der Beobachtung zum Ausdruck, daß TTX selektiv die Natrium-"Kanäle" der Schnürringmembran blockiert (HILLE, 1968a), während TEA fast ebenso selektiv nur die K-"Kanäle" verschließt (KOPPENHÖFER, 1967; HILLE, 1967). Der in der vorliegenden Arbeit erhobene Befund,

daß $\overline{P}_{Na}$ und die Leckleitfähigkeit der vergifteten Membran durch Erhöhung der Calcium-Außenkonzentration überhaupt nicht, P'_K dagegen um über 50 % erhöht wird, unterstreicht diese Ansicht.

Das gilt weitgehend auch für die mit Skorpiongift behandelte Membran (KOPPENHÖFER und SCHMIDT, 1968a). Darüber hinaus zeigen die vorliegenden Versuche auch eine völlig unterschiedliche Beeinflussung des Aktivierungs- und Inaktivierungsmechanismus der Natriumpermeabilität durch Calciumionen. Der Aktivierungsvorgang (Variable m der Ionentheorie, siehe Seite 15) wird in derselben Weise verändert wie am normalen Schnürring (siehe oben), der Inaktivierungsmechanismus (Variable h der Ionentheorie) wird weitgehend normalisiert. Es kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, daß Aktivierung und Inaktivierung separate, an unterschiedliche Membranstrukturen gebundene Prozeße darstellen.

Unabhängig davon, wie der Mechanismus der Calciumwirkung in der Membran zu erklären sein mag, bleibt festzustellen, daß die spezifischen Ionenpermeabilitäten der vergifteten Schnürringmembran in einer Weise verändert werden, daß die Bedingungen für eine Dauerdepolarisation und die Entstehung spontaner und langdauernder Aktionspotentiale verschlechtert bzw. beseitigt werden. Damit findet auch die von ABDULLAH (1957) erwähnte Therapie von Skorpionvergiftungen durch Injektion von 10 %iger $CaCl_2$-Lösung eine elektrophysiologisch begründete Erklärung. Dieser Autor beschreibt eine geradezu "dramatische" unmittelbar nach der Calcium-Injektion eintretende und anhaltende Besserung des lebensgefährlichen Zustandes seiner Patienten.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Wirkung von Calciumionen auf die Ionenströme des mit Skorpiongift behandelten Ranvierschen Schnürrings von Xenopus laevis wurde in voltage clamp Experimenten analysiert.

2. Erhöhung der Calcium-Außenkonzentration auf das vierfache des Normalwertes beeinflußt die Natriumpermeabilität P_{Na} und die Kaliumpermeabilität P_K in folgender Weise:

   a) die maximale Natriumpermeabilität $\overline{P}_{Na}$ wird nicht verändert; die P_{Na} - Kurve wird um etwa 8 mV nach höheren Depolarisationen hin verschoben;

   b) die Natriumaktivierung wird geringfügig verzögert. Die m_∞ - Kurve wird um etwa 10 mV in Depolarisationsrichtung verschoben;

   c) die für den vergifteten Schnürring charakteristische unvollständige Natriuminaktivierung wird beseitigt. Die Zeitkonstanten der schnellen und der langsamen Inaktivierungsphasen werden nicht verändert;

   d) die maximale Kaliumpermeabilität $P^{\bullet}_K$ nimmt im Mittel von 45 % auf 68 % des Normalwertes zu; die Geschwindigkeit des Anstieges von P_K wird nicht verändert.

3. Die starke Verkürzung des Aktionspotentials sowie die Hemmung der Spontantätigkeit des vergifteten Schnürrings durch Calciumionen können auf die Beseitigung der unvollständigen Inaktivierung und die Zunahme der Kaliumpermeabilität zurückgeführt werden.

Herrn Professor Dr. H. SCHMIDT danke ich für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit sowie für Rat und Hilfe bei ihrer Durchführung.

LITERATURVERZEICHNIS

ABDULLAH, S. : Calciumchloride for Scorpion bites.
Brit. med. J. 8, 1366 (1957).

ADAM, K.R., H. SCHMIDT, R. STÄMPFLI and C. WEISS:
The effect of scorpion venom on single myelinated nerve fibres of the frog.
Brit. J. Pharmacol. 26, 666 - 677 (1966).

BRADY, A.J. and J.W. WOODBURY: The sodium-potassium hypothesis as the basis of electrical activity in frog ventricle.
J. Physiol. 154, 385 (1960).

DECK, K.A. and W. TRAUTWEIN: Ionic currents in cardial excitation.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 280, 63 (1964).

DODGE, F. and B. FRANKENHAEUSER: Membrane currents in isolated frog nerve fibre under voltage clamp conditions.
J. Physiol. (Lond.) 143, 76 - 90 (1958).

FRANKENHAEUSER, B.: A method for recording resting and action potentials in the isolated myelinated frog nerve fibre.
J. Physiol. (Lond.) 135, 550 - 559 (1957a).

FRANKENHAEUSER, B.: The effect of calcium on the myelinated nerve fibre.
J. Physiol. 137, 245 - 260 (1957b).

FRANKENHAEUSER, B.: Delayed currents in myelinated nerve fibres of Xenopus laevis investigated with voltage clamp technique.
J. Physiol. (Lond.) 160, 40 - 45 (1962).

FRANKENHAEUSER, B.: A quantitative description of potassium currents in myelinated nerve fibres of Xenopus laevis.
J. Physiol. (Lond.) 169, 424 - 430 (1963).

FRANKENHAEUSER, B. and A. L. HODGKIN: The action of calcium on the electrical properties of squid axons.
J. Physiol. 137, 218 - 244 (1957).

GOLDMAN, D.E.: Potential, impedence and rectification in membranes.
J. gen. Physiol. 27, 37 - 60 (1943).

HILLE, B.: The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraaethylammonium ion.
J. gen. Physiol. 50, 1287 - 1302 (1967).

HILLE, B.: Pharmacological modifications of the sodium channels of frog nerve.
J. gen. Physiol. 51, 199 - 219 (1968a).

HILLE, B.: Charges and potentials at the nerve surface.
J. gen. Physiol. 51, 221 - 236 (1968b).

HILLE, B.: Ionic channels in nerve membranes.
In Progress in Biophysics and Molecular Biology 21, 1 - 32; Herausgeber J.A.V. Butler und D. Noble, Pergamon Press Oxford and New York, 1970.

HODGKIN, A.L. and A.F. HUXLEY: A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.
J. Physiol. (Lond.) 117, 500 - 554 (1952).

KOPPENHÖFER, E.: Die Wirkung von Tetraaethylammoniumchlorid auf die Membranströme Ranvierscher Schnürringe von Xenopus laevis.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 293, 34 - 55 (1967).

KOPPENHÖFER, E. und H. SCHMIDT: Die Wirkung von Skorpiongift auf die Ionenströme des Ranvierschen Schnürrings. I. Die Permeabilitäten P_{Na} und P_K.
Pflügers. Arch. ges. Physiol. 303, 133 - 149 (1968a).

KOPPENHÖFER, E. und H. SCHMIDT: Die Wirkung von Skorpiongift auf die Ionenströme des Ranvierschen Schnürrings. II. Unvollständige Natrium-Inaktivierung.
Pflügers. Arch. ges. Physiol. 303, 150 - 161 (1968b).

Mc ALLISTER, R.E. and D. NOBLE: The time and voltage dependence of the slow outward curent in cardiac Purkinje fibres.
J. Physiol. 186, 632 (1966).

MEVES, H.: Die Wirkung von $NiCl_2$ auf den isolierten Ranvierschen Schnürring. Pflügers Arch. ges. Physiol. 278, 273 - 295 (1963).

NONNER, W.: A new voltage clamp method for Ranvier nodes. Pflügers Arch. ges. Physiol. 309, 176 - 199 (1969).

NOBLE, D.: A modification of the Hodgkin-Huxley equations applicable to Purkinje fibres action and pace maker potentials. J. Physiol. 160, 317 (1962).

ROCHAT, C., H. ROCHAT, F. MIRANDA and S. LISSITZKI: Purification and some properties of the neurotoxins of Androctonus australis Hector. Biochemistry 6, 578 - 585 (1967).

SCHMIDT, H. und R. STÄMPFLI: Die Wirkung von Tetraaethylammoniumchlorid (TEA) auf die elektrischen Eigenschaften der Schnürringmembran. Pflügers Arch. ges. Physiol. 279, R 36 - 37 (1966).

STÄMPFLI, R.: Bau und Funktion markhaltiger Nervenfasern. Ergebn. Physiol. 47, 70 - 165 (1952).

TASAKI, I.: Demonstration of two stable states of the nerve membrane in potassium rich media. J. Physiol. (Lond.) 148, 306 - 331 (1959).

WEIDMANN, S.: Effect of current flow on the membrane potential af cardiac muscle. J. Physiol. 115, 227 - 236 (1951).

LEBENSLAUF

Am 3. April 1943 wurde ich als Sohn des Oberlehrers Josef Schmitt und seiner Ehefrau Maria geb. Schröder in Eiweiler-Saar geboren.

Die Einschulung erfolgte 1949 in die Volksschule Eiweiler, die ich bis 1954 besuchte, um dann auf das Realgymnasium in Völklingen überzuwechseln. Nach bestandenem Abitur im Jahre 1963 immatrikulierte ich mich an der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes in Saarbrücken.

Im Februar 1964 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Februar 1966 die ärztliche Vorprüfung ab. Anschließend studierte ich je ein Semester an der medizinischen Fakultät in Heidelberg und Wien.

Im Juli 1969 erhielt ich in Homburg das Zeugnis der ärztlichen Prüfung. Seit September 1969 bin ich am I. Physiologischen Institut der Universität des Saarlandes beschäftigt.

Homburg, den 22. Oktober 1970

Hans Schmitt